

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 1 月 15 日 (15.01.2004)

PCT

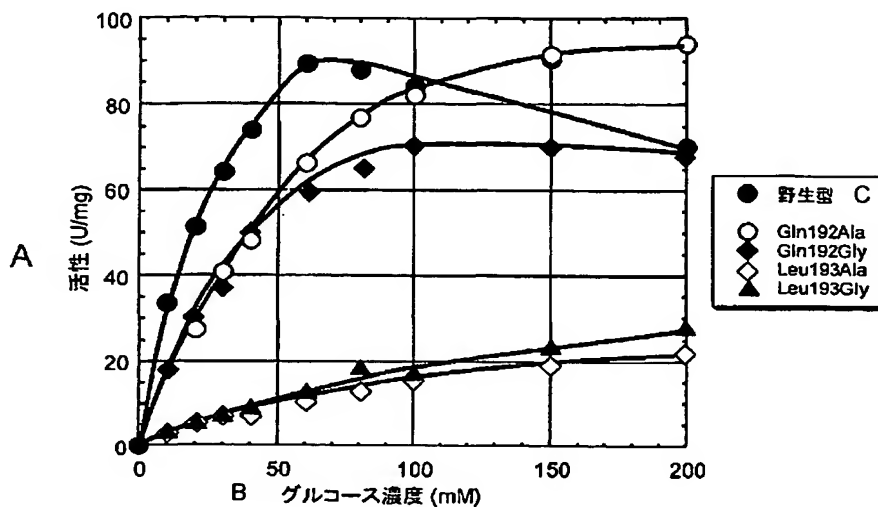
(10) 国際公開番号  
WO 2004/005499 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/04, 15/53, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/32
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008418
- (22) 国際出願日: 2003 年 7 月 2 日 (02.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-196177 2002 年 7 月 4 日 (04.07.2002) JP  
特願2003-71760 2003 年 3 月 17 日 (17.03.2003) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 早出 広司 (SODE,Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東京都目黒区南 1-13-16 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 田中 玲子, 外 (TANAKA,Reiko et al.); 〒100-6036 東京都千代田区霞が関 3 丁目 2 番 5 号 霞が関ビル 3 6 階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

[続葉有]

(54) Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: グルコース脱水素酵素



A...ACTIVITY (U/mg)  
B...GLUCOSE CONCENTRATION (mM)  
C...WILD TYPE

(57) Abstract: It is intended to disclose a modified glucose dehydrogenase characterized in that, in glucose dehydrogenase accompanied by pyrroloquinoline quinone as a coenzyme, one or more amino acid residues are substituted by other amino acid residues in the region of from the 186- to 206-residues in water-soluble PQQGDH originating in *Acinetobacter calcoaceticus* or an equivalent region of another species. It is also intended to provide a gene encoding the modified glucose dehydrogenase as described above, a vector containing the gene, a transformant containing the gene, and a glucose assay kit and a glucose sensor containing the modified glucose dehydrogenase as described above.

[続葉有]



GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、Acinetobacter calcoaceticus由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素が開示される。本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

明細書  
グルコース脱水素酵素

技術分野

- 5 本発明はピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素（P Q Q G D H）の製造、およびグルコースの定量におけるその使用に関する。

背景技術

- 10 血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーである。また、微生物を用いる発酵生産においては、プロセスをモニタリングするためにグルコース濃度を定量する。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ（G O D）あるいはグルコース 6 リン酸脱水素酵素（G 6 P D H）を用いる酵素法により定量されていた。しかし、G O Dを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加す
- 15 る必要があった。G 6 P D Hは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるN A D（P）を添加しなければならない。

- そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてP Q Q G D Hの応用が注目されている。P Q Q G D Hは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化
- 20 してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。

- P Q Q G D Hには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性P Q Q G D Hは、分子量約8 7 k D aのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。例えば、AM. Cleton- Jansen et al., J. Bacteriol. (1990) 172, 6308-6315 を参照されたい。一方、水溶性P Q Q G D Hは *Acinetobacter calcoaceticus* のいくつかの株においてその存在が確認されており（Biosci. Biotech. Biochem.(1995),59(8),1548-1555）、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている（Mol. Gen. Genet.(1989),217:430-436）。*A. calcoaceticus* 由来水溶性P Q Q G D Hは、分子量約5 0 k D aのホモダイマーである。他のP Q Q酵素とは蛋白質の一次構
- 25

造上でのホモロジーがほとんどない。

最近、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来の水溶性 P Q Q G D H の X 線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした本酵素の高次構造が明らかとなった。(A.Oubrie et al., J. Mol. Biol., 289, 319-333(1999); A. Oubrie et al., The EMBO Journal, 18(19) 5187-5194 (1999); A. Oubrie et al. PNAS, 96(21), 11787-11791 (1999))。これらの論文によれば、水溶性 P Q Q G D H は 6 つの W-モチーフから構成される  $\beta$  プロペラ蛋白質であることが明かとなった。

P Q Q G D H はグルコースに対して高い酸化活性を有していること、および P Q Q G D H は補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。しかしながら P Q Q G D H はグルコースに対する選択性が低いことが問題であった。

したがって本発明は、グルコースに対する選択性が高い改変型水溶性 P Q Q G D H を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

本発明者は水溶性 P Q Q G D H を遺伝子工学的に改良してそのグルコースに対する選択性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型 P Q Q G D H を開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性 P Q Q G D H の特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースに対する選択性が高い酵素を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を有する改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して高い選択性を有する。好ましくは本発明の改変型 P Q Q G D H は、グルコースに対する反応性と比べて、ラクトースあるいはマルトースに対する反応性が野生型より低下している。より

好ましくは、グルコースに対する反応性を100%とした場合、ラクトースあるいはマルトースに対する活性が50%以下であり、より好ましくは40%以下であり、さらに好ましくは30%以下である。

本発明の1つの態様においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基（すなわち天然に存在するPQQグルコース脱水素酵素中の対応するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基）で置換されている。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

本明細書においてアミノ酸残基の位置または領域に関して用いる場合、「同等の」との用語は、構造上類似するが同一ではない2以上の蛋白質において、あるアミノ酸残基または領域が等価の生物学的または生化学的機能を有することを表す。例えば、*Acinetobacter calcoaceticus* 以外の生物に由来する水溶性PQQGDHにおいて、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から206残基の領域とアミノ酸配列類似性の高い領域が存在し、かつ蛋白質の二次構造から見て該領域がその蛋白質において同じ役割を果たしていると合理的に考えられる場合、該領域は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から206残基の領域と同等の領域」と言われる。さらに、該領域の第7番目のアミノ酸残基は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第192残基と同等の位置のアミノ酸残基」と言われる。

好ましくは、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの192番目のグルタミン残基もしくは193番目のロイシン残基、または他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグ

ルタミン残基は、アラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。

5 本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基と167番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基は、アラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、  
10 基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。

15 本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されているグルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号1  
20 で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている。

25 本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フ

フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている。

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基がアラニン残基、グリシン残基、メチオニン残基、トリプトファン残基あるいはリジン残基で置換されている。

また別の観点においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、配列：

Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない)を含む。好ましくはXaa1はAla、Gly、Glu、Leu、Phe、SerまたはAspであり、Xaa2はAlaまたはGlyである。

本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

本発明の改変型グルコース脱水素酵素の酵素蛋白質はグルコースに対して高い選択性を示し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高選択的かつ高感度の測定に応用することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成するために用いたプラスミドpGB2の構造を示す。

図2は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成する

方法を示す。

図3は、本発明の改変型PQQGDHの活性の基質濃度依存性を示すグラフである。

## 5 発明の詳細な説明

### 改変型PQQGDHの構造

本発明の好ましい改変型グルコース脱水素酵素においては、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、  
10 配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されているか、または193番目のロイシン残基がアラニン残基、グリシン残基、メチオニン残基、トリプトファン残基、またはリジン残基で置換されている。

15 また別の態様においては、本発明の改変型PQQGDHは、上述の置換に加えて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で、特に好ましくはグルタミン酸残基で置換されている。また好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、上述の置換に加えて、452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で、特に好ましくはトレオニン残基  
20 で置換されている。167番目のアスパラギン酸残基および452番目のアスパラギン残基がPQQGDHによる基質の認識および結合に関与することは、それぞれ特開 2001-346587 および特開 2001-197888 に記載されている。しかし、一般的には、異なるドメインに存在するアミノ酸残基に同時に変異を導入することにより、基質の選択性や酵素活性がどのように変化するかについては、全く予測  
25 することができない。場合によっては、酵素活性が全く失われることもある。したがって、本発明において、これらの変異を同時に導入することによりグルコースの選択性の向上が得られたことは、驚くべき発見であった。

また別の観点においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、配列：  
Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu



(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1 が Gln であるとき Xaa2 は Leu ではない)を含む。好ましくは Xaa1 は Ala、Gly、Glu、Leu、Phe、Ser または Asn であり、Xaa2 は Ala または Gly である。

## 5 改変型PQQGDHの製造方法

Acinetobacter calcoaceticus 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、置換すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列を、所望のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野において知られており、例えば、Sambrook ら, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York に記載されている。

15 このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

20 本発明の改変型PQQGDHにおいては、所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野においてよく知られている。

25 さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、Acinetobacter calcoaceticus 由来の水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域と同等の領域を容易に認識することができ、本発明にしたがって、この領域中のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、グルコース選択性の向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発

明の範囲内である。

上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

10

#### 酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PM S（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2，6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

15

#### 20 グルコースに対する選択性

本発明のPQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質として、2-デオキシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-オ-メチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトース等の各種の糖を用いて上述のように酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べることにより評価することができる。

25

本発明の改変型PQQGDHは野生型酵素と比較して、グルコースに対する選択性が向上しており、特にマルトースに対する反応性と比較してグルコースに対する反応性が高い。したがって、本改変型酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーはグルコース測定に関して選択性が高く、種々の糖が存

在する試料においても高感度でグルコースが検出できるという利点を有する。

#### グルコースアッセイキット

- 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

#### グルコースセンサー

- 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化することが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよび $\text{CaCl}_2$ 、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメ

トサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型 P Q Q G D H を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えば A g / A g C l 電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願 2 0 0 3 - 7 1 7 6 0 ならびに 2 0 0 2 - 1 9 6 1 7 7 号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

## 15 実施例 1

### 改変型酵素 P Q Q G D H 遺伝子の構築

配列番号 2 に示される *Acinetobacter calcoaceticus* 由来 P Q Q G D H の構造遺伝子をもとに、変異の導入を行った。プラスミド p G B 2 は、ベクター p T r c 9 9 A （ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来 P Q Q G D H をコードする構造遺伝子を挿入したものである（図 1）。常法に従って部位特異的変異法により 1 9 2 番目のグルタミン残基または 1 9 3 番目のロイシン残基をコードする塩基配列を、それぞれアラニン残基、グリシン残基、メチオニン残基、トリプトファン残基、またはリジン残基をコードする塩基配列に置換した。さらに、1 6 7 番目のアスパラギン酸残基または 4 5 2 番目のアスパラギン残基をコードする塩基配列を、それぞれグルタミン酸残基またはグリシン残基をコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミド p G B 2 を用いて、図 2 に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を表 1 に示す。2 カ所の変異を有する変異体を作成するためには、2 種類のオリゴヌクレオチドターゲットプライマ

一を同時に用いて上記と同様に変異を導入した。

表 1

Gln192Ala	5'- ata agc aag cgg gtt acg ccc -3'
Gln192Gly	5'- caa ata agc aag ccc gtt acg ccc ttg -3'
Gln192Leu	5'-caa ata agc aag cag gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Phe	5'-caa ata agc aag aaa gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Ser	5'-caa ata agc aag gct gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Asn	5'-caa ata agc aag gtt gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Asp	5'-caa ata agc aag atc gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Glu	5'-caa ata agc aag ttc gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Lys	5'-caa ata agc aag ttt gtt acg ccc ttg-3'
Leu193Ala	5'- caa ata agc agc ctg gtt acg -3'
Leu193Gly	5'- gaa caa ata agc acc ctg gtt acg ccc -3'
Leu193Met	5'-gaa caa ata agc cat ctg gtt acg ccc-3'
Leu193Trp	5'-gaa caa ata agc ttt ctg gtt acg ccc-3'
Leu193Lys	5'-gaa caa ata agc cca ctg gtt acg ccc-3'
Asp167Glu	5'- cc tga ctg atg ttc ttt tga tga agg -3'
Asn452Thr	5'- c atc ttt ttg gac agt tcc ggc agt at -3'

5

ベクタープラスミド pKF18k (宝酒造 (株)) に *Acinetobacter calcoaceticus* 由来 PQGDH をコードする遺伝子の一部を含む Kpn I-Hind III 断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 50 fmol と宝酒造 (株) 製 Mutan (登録商標) -Express Km キットに付属のセレクションプライマー 5 pmol、リン酸化したターゲットプライマー 50 pmol を全体 (20  $\mu$ l) の 1/10 量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3 分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1 本鎖にした。セレクションプライマーは pKF18k のカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを 5 分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに 3  $\mu$ l の同キットエクステンションバッファー、1  $\mu$ l の T4 DNA リガーゼ、1  $\mu$ l の T4 DNA ポリメラーゼおよび 5  $\mu$ l の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。これを DNA のミスマッチ修復能欠損株である *E. coli* BMH71-18 mutS に形質転換し、一晚振と

15

う培養を行ってプラスミドを増幅させた。

次に、ここから抽出したプラスミドを *E. coli* MV 1 1 8 4 に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミド p GB 2 上の野生型 P Q Q G D H をコードする遺伝子の Kpn I-Hind III 断片と入れ替え、改変型 P Q Q G D H の遺伝子を構築した。

## 実施例 2

### 改変型酵素の調製

- 10 野生型または改変型 P Q Q G D H をコードする遺伝子を、*E. coli* 用の発現ベクターである p T r c 9 9 A (ファルマシア社) のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドを *E. coli* DH 5  $\alpha$  株に形質転換した。これを 4 5 0 m l の L 培地 (アンピシリン 5 0  $\mu$  g / m l 、クロラムフェニコール 3 0  $\mu$  g / m l 含有) で坂口フラスコを用いて 3 7  $^{\circ}$ C で一晩振とう培養し、1 m M
- 15 C a C l <sub>2</sub>、5 0 0  $\mu$  M P Q Q を含む 7 l の L 培地に植菌した。培養開始後約 3 時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度 0 . 3 m M になるように添加し、その後 1 . 5 時間培養した。培養液から遠心分離 (5000  $\times$  g、1 0 分、4  $^{\circ}$ C) で菌体を回収し、この菌体を 0 . 8 5 % N a C l 溶液で 2 回洗浄した。集菌した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離 (10000  $\times$  g、1 5 分、4  $^{\circ}$ C) で未破
- 20 碎の菌体を除去した。上清を超遠心分離 (160500  $\times$  g (40000 r.p.m.)、9 0 分、4  $^{\circ}$ C) し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

## 実施例 3

### 25 酵素活性の測定

実施例 2 で得られた野生型および各改変型 P Q Q G D H の粗精製酵素標品をそれぞれ 1  $\mu$  M P Q Q、1 m M C a C l <sub>2</sub> 存在下で 1 時間以上ホロ化した。これを 1 8 7  $\mu$  l ずつ分注し、3  $\mu$  l の活性試薬 (6 m M D C I P 4 8  $\mu$  l、6 0 0 m M P M S 8  $\mu$  l、1 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 0 1 6  $\mu$  l) および各濃

度のD-グルコース溶液10  $\mu$ lを加え、酵素活性を測定した。

酵素活性の測定は、室温において、10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH 7.0）中においてPMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1  $\mu$ molのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH 7.0におけるモル吸光係数は16.3  $\text{mM}^{-1}$ とした。

基質濃度対酵素活性のプロットから、 $K_m$ を求めた。結果を表2に示す。

表2

	グルコースに対する $K_m$ 値(mM)	$V_{\max}$ (U/mg)
野生型	30	129
Gln192Ala	50	123
Gln192Gly	36	94
Leu193Ala	177	42
Leu193Gly	157	46
Leu193Met	98	176
Leu193Trp	25	17
Leu193Lys	41	36

#### 実施例4

##### 15 基質特異性の評価

各改変型酵素の粗精製酵素標品について基質特異性を調べた。実施例2で得られた野生型および各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ1  $\mu$ MPQQ、1mM  $\text{CaCl}_2$ 存在下で1時間以上ホロ化した。これを187  $\mu$ lずつ分注し、3  $\mu$ lの活性試薬（6mM DCIP, 600mM PMS, 10mM リン酸緩衝液pH 7.0を含む）および基質を加えた。基質として、それぞれ終濃度20mMまたは100mMとなるように400mMのグルコースまたは他の糖を加え、室温で30分間インキュベートして、実施例3と同様に酵素活性を測

定した。値はグルコースを基質としたときの活性を100%とし、これに対する相対活性で表した。結果を表3-6に示す。

表 3

	野生型	Gln192Ala	Gln192Gly	Leu193Ala	Leu193Gly
基質濃度	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
アロース	45	29	34	50	39
3-O-m- グルコース	82	80	101	66	60
ガラクトース	8	10	12	34	26
マルトース	49	20	24	39	30
ラクトース	53	56	40	64	56
セロビオース	85	138	85	84	71

表 4

	野生型	Gln192Ala	Gln192Gly	Leu193Ala	Leu193Gly
基質濃度	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
アロース	62	41	45	47	35
3-O-m- グルコース	92	93	98	86	59
ガラクトース	8	6	19	25	17
マルトース	51	56	44	50	46
ラクトース	51	56	44	50	46
セロビオース	42	73	59	59	39



表 5

基質濃度	野生型			Gln192Leu		Gln192Phe		Gln192Ser		Gln192Asp		Gln192Glu	
	20mM	100mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
2-デオキシ グルコース	0	5	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
マンノース	7	9	0	0	0	2	0	5	0	0	0	0	0
アロース	41	65	70	78	31	62	89	19	7	26	17	16	16
3-O-m- グルコース	80	97	84	90	62	89	19	7	0	46	50	63	63
ガラクトース	8	6	23	20	61	61	19	19	1	1	2	4	4
キシロース	5	8	17	26	28	28	7	7	0	0	0	0	0
ラクトース	58	59	63	54	105	105	66	66	57	57	53	60	60
マルトース	67	55	55	36	31	31	35	35	8	8	1	8	8
セロビオース	85	44	90	55	55	55	55	55	148	148	82	82	82

表 6

	野生型	Leu193Met	Leu193Thp	Leu193Lys
基質濃度	20mM	20mM	20mM	20mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
ガラクトース	11	36	24	43
キシロース	7	17	6	8
ラクトース	61	59	76	48
マルトース	61	39	17	31

- 5      また、二重変異を有する本発明の改変型酵素を用いて、酵素活性を測定した結果を表 7-8 に示す。本発明の改変型酵素はいずれも、マルトースに対する反応性と比較してグルコースに対する高い反応性を示した。

表 7

10

	Asp167Glu/ Asn452Thr	Gln192Gly/ Asn452Thr
基質濃度	20mM	20mM
グルコース	100(%)	100(%)
アロース	2	32
3-O-m-グル コース	4	98
ガラクトース	2	14
マルトース	2	46
ラクトース	12	21

表 8

	野生型		Asp167Glu/ Leu192Ala		Asp167Glu/ Leu192Gly		Asp167 Glu/Gln 192Leu		Asp167Glu/ Gln192Ser		Asp167Glu/ Gln192Asn		Asp167 Glu/Gln 192Glu		Asp167 Glu/Gln 192Lys	
	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	100mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM
基質濃度																
グルコース		100(%)		100(%)		100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
2-デオキシ グルコース	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	1	8		
マンノース	7	9	1	0	0	0	0	0	0	0	2	9	3	11		
アロース	41	65	6	5	6	7	2	1	0	16	26	5	63			
3-O-m グルコース	80	97	2	4	6	8	2	0	0	9	14	6	35			
ガラクトース	8	6	5	7	1	4	21	3	0	10	12	9	70			
キシロース	5	8	0	1	0	0	5	0	0	3	9	2	9			
ラクトース	58	59	58	61	50	43	57	61	43	49	44	54	90			
マルトース	67	55	11	11	1	5	22	6	3	42	40	16	49			
セロビオース	85	44	.	107	215	130	195	240	131	.	61	.	74			

### 実施例 5

#### 基質濃度依存性

本発明の改変型 P Q Q G D H の活性の基質濃度依存性を調べた。各改変型酵素  
5 を、 $1 \mu\text{M}$  P Q Q、 $1 \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$  存在下で 1 時間以上ホロ化し、各種濃度  
のグルコースおよび  $5 \mu\text{M}$  P Q Q、 $10 \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$  存在下で酵素活性を測  
定した。方法は実施例 3 に記載の酵素活性の測定法に準じ、D C I P の  $600 \text{nm}$   
10 の吸光度の変化を指標とした。結果を図 3 に示す。本発明の改変型 P Q Q G D  
H は、野生型と比較して高いグルコース濃度において飽和する。また、いずれも  
グルコース濃度  $200 \text{mM}$  まで基質阻害が見られず、 $K_{\text{si}}$  は  $200 \text{mM}$  以上で  
あった。

### 実施例 6

#### 酵素の精製

15 実施例 2 で得られた野生型および Gln192Asp 粗精製酵素をそれぞれ  $10 \text{mM}$   
リン酸緩衝液  $\text{pH} 7.0$  で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カ  
ラム T S K g e l C M - T O Y O P E A R L 650M (東ソー株式会社) に  
吸着させた。このカラムを  $10 \text{mM}$  リン酸緩衝液  $\text{pH} 7.0$ 、 $750 \text{ml}$  で洗浄  
した後、 $0-0.2 \text{M}$   $\text{NaCl}$  を含む  $10 \text{mM}$  リン酸緩衝液  $\text{pH} 7.0$  を用い、  
20 酵素を溶出させた。流速は  $5 \text{ml}/\text{min}$  で行った。GDH 活性を有する画分を  
回収し、 $10 \text{mM}$  M O P S - N a O H 緩衝液 ( $\text{pH} 7.0$ ) で一晩透析した。  
このようにして電気泳動的に均一な改変型 P Q Q G D H 蛋白質を得た。得られた  
精製酵素標品について、各基質に対する酵素活性を測定した。結果を表 9-10  
に示す。

表 9

	野生型						Glu192Asp			
	Km (mM)	Vmax (U/mg)	kcat (sec <sup>-1</sup> )	kcat/Km (mM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )	Km (mM)	Vmax (U/mg)	kcat (sec <sup>-1</sup> )	kcat/Km (mM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )		
グルコース	25.0	4610	3860	154(100%)	50.0	475	398	8.0(100%)		
アロース	35.5	2997	2509	71(46%)	57.2	226	189	3.3(42%)		
3-O-m- グルコース	28.7	3596	3011	105(68%)	64.4	310	260	4.0(51%)		
ガラクトース	5.3	277	232	44(29%)	118.9	137	115	1.0(12%)		
ラクトース	18.9	1982	1659	88(57%)	75.0	390	327	4.4(54%)		
マルトース	26.0	2305	1930	74(48%)	95.8	77	64	0.7(8%)		

表 10

Asp167Glu/Asn452Thr			
	Km (mM)	kcat (sec <sup>-1</sup> )	kcat/Km (mM <sup>-1</sup> · sec <sup>-1</sup> )
グルコース	48	1193	25(100%)
アロース	182	73	0.4(2%)
3-O-m-グルコース	198	215	1.1(4%)
ガラクトース	145	89	0.6(2%)
ラクトース	55	167	3(12%)
マルトース	147	65	0.4(2%)
セロビオース	16	226	14(56%)

### 実施例 7

#### 5 酵素センサーの作製および評価

5 ユニットの Gln192Ala 改変型酵素にカーボンペースト 20 mg を加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約 40 mg 充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を 1% のグルタルアルデヒドを含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で 10 室温で 30 分間処理した後、20 mM リジンを含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 20 分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で 1 時間以上平衡化させた。電極は 4℃ で保存した。

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変 15 型 PQQGDH を固定化した酵素センサーを用いて、0.1 mM - 5 mM の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

### 産業上の利用性

本発明の改変型水溶性 PQQGDH は、グルコースに対する選択性が高いため、 20 血中グルコース測定用センサーの素子として有用である。

## 請求の範囲

1. ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が  
5 他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を有する改変型グルコース脱水素酵素。
2. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、  
10 *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。
3. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、  
15 *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの192番目のグルタミン残基もしくは他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
4. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、  
配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
- 20 5. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項4記載の改変型グルコース脱水素酵素。
6. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、  
25 配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基と167番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
7. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ192番目のグルタミン残基がアラ

ニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項6記載の改変型グルコース脱水素酵素。

8. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項6記載の改変型グルコース脱水素酵素。

9. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

10. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項9記載の改変型グルコース脱水素酵素。

11. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている、請求項9記載の改変型グルコース脱水素酵素。

12. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

13. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項12記載の改変型グルコース脱水素酵素。

14. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニ



ン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている、請求項12記載の改変型グルコース脱水素酵素。

15. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、  
5 Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの193番目のロイシン残基もしくは他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

16. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、  
10 配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

17. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基が、アラニン残基、グリシン残基、メチオニン残基、トリプトファン残基、またはリジン残基で置換されている、請求項16記載の改変型グルコース脱水素酵素。

18. ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、  
15 配列

Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない)

を含むことを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

- 20 19. Xaa1がAla、Gly、Glu、Leu、Phe、SerまたはAspであり、Xaa2がAlaまたはGlyである、請求項18記載の改変型グルコース脱水素酵素。

20. 請求項1-19のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

21. 請求項20に記載の遺伝子を含むベクター。

- 25 22. 請求項20に記載の遺伝子を含む形質転換体。

23. 請求項20に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項22記載の形質転換体。

24. 請求項1-19のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

25. 請求項1-19のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

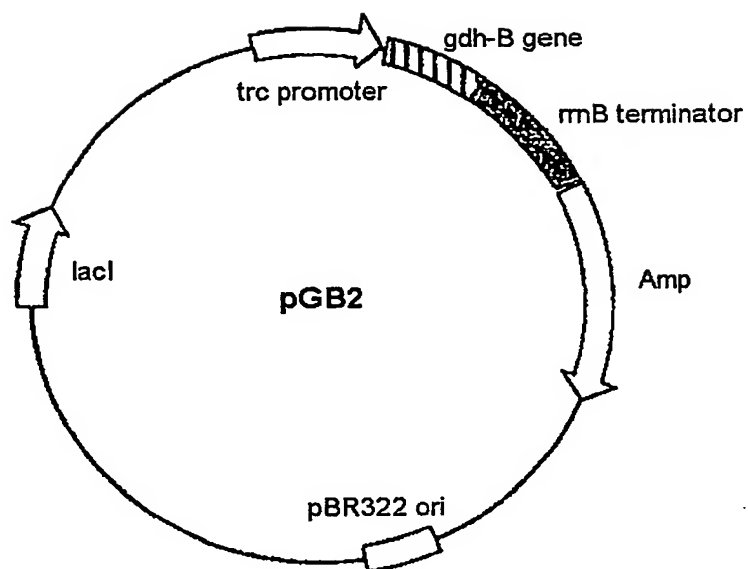


図 1

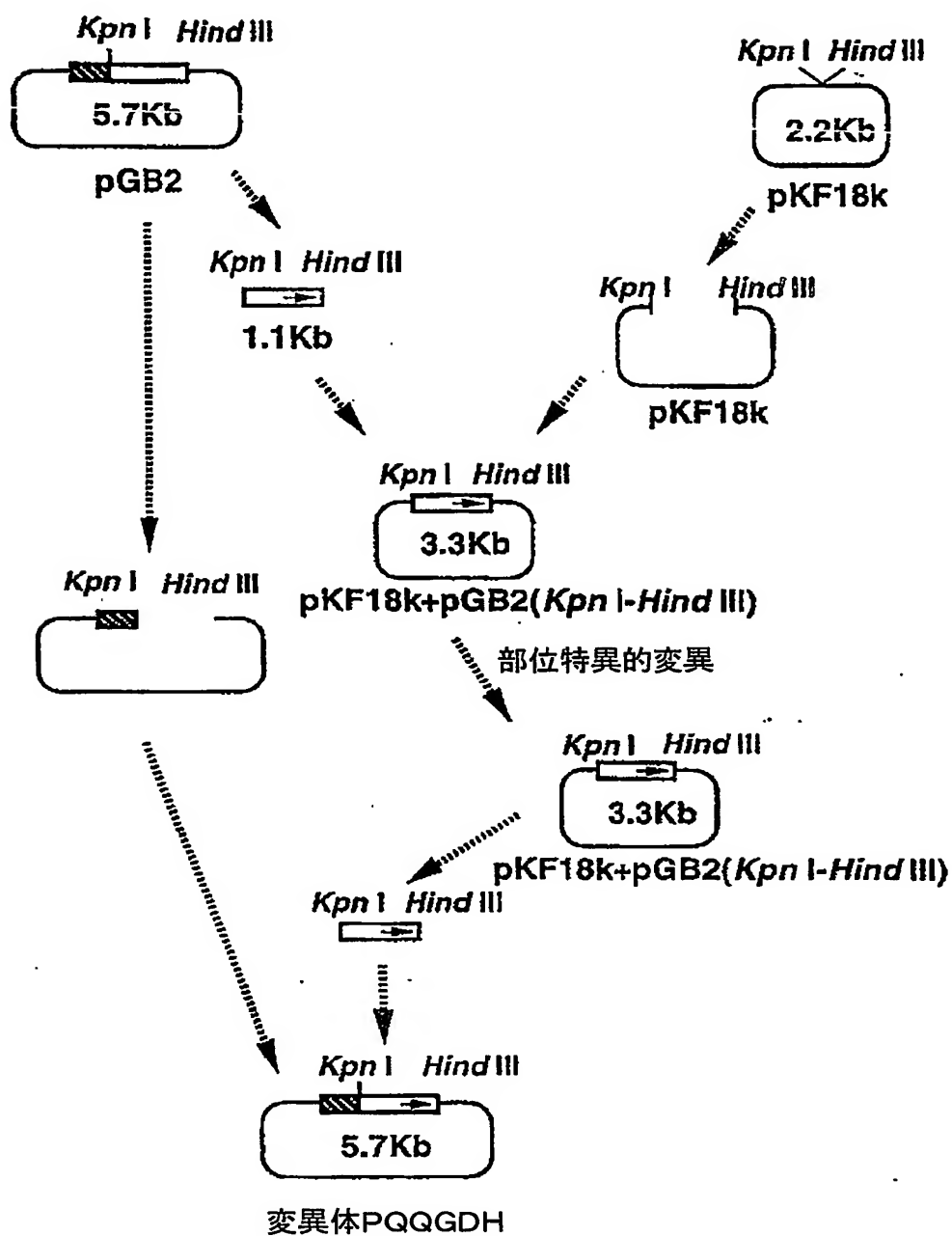


図 2

3/3

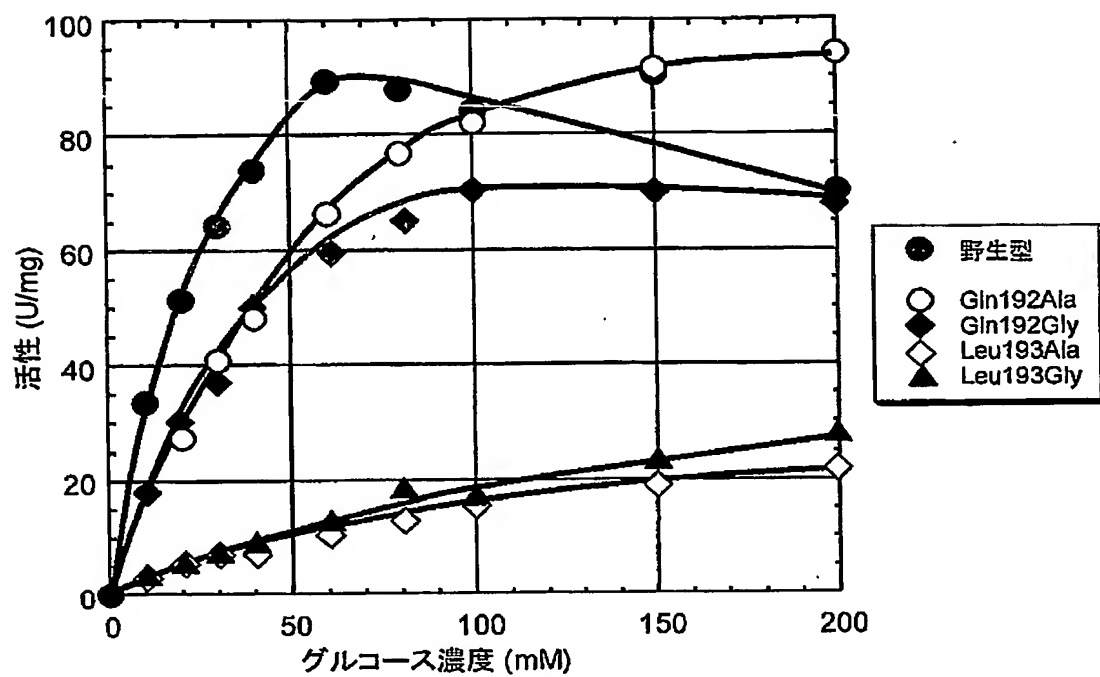


図 3

## Sequence Listing

&lt;110&gt; Sode, Koji

&lt;120&gt; Glucose Dehydrogenase

&lt;130&gt; psd9010W0

&lt;150&gt; JP 2003-71760

&lt;151&gt; 2003-03-17

&lt;150&gt; JP 2002-196177

&lt;151&gt; 2002-07-04

&lt;160&gt; 19

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 454

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Acinetobacter calcoaceticus

&lt;400&gt; 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn

1 5 10 15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu

20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

35 40 45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe

50 55 60

Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu

65 70 75 80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile

85 90 95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn

100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu

115 120 125

Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His

130

135

140

Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr

145

150

155

160

Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn

165

170

175

Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr

180

185

190

His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile

195

200

205

Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr

210

215

220

Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys

225

230

235

240

Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu

245

250

255

Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys

260

265

270

Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys

275

280

285

Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val

290

295

300

Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro

305

310

315

320

Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro

325

330

335

Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser

340

345

350

Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu

355

360

365

Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile

370 375 380  
Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met  
385 390 395 400  
Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly  
405 410 415  
Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp  
420 425 430  
Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys  
435 440 445  
Phe Thr Tyr Lys Ala Lys

450

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1612

&lt;212&gt; DNA

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

&lt;400&gt; 2

agctactttt atgcaacaga gcctttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60  
cataatacaa atcatataga gaactcgtac aaacccttta ttagaggttt aaaaattctc 120  
ggaaaatttt gacaatttat aaggtggaca catgaataaa catttattgg ctaaaattgc 180  
tttattaagc gctgttcagc tagttacact ctcagcattt gctgatgttc ctctaactcc 240  
atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagttattc tatctaattc 300  
aaataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggttaa ctgagcgagc 360  
aacaggtaaag attctaagag ttaatccaga gtcgggtagt gtaaaaacag tttttcaggt 420  
accagagatt gtcaatgatg ctgatgggca gaatggttta ttaggttttg ccttccatcc 480  
tgattttaaa aataatcctt atatctatat ttcaggtaca tttaaaaatc cgaaatctac 540  
agataaagaa ttaccgaacc aaacgattat tcgtcgttat acctataata aatcaacaga 600  
tacgctcgag aagccagtcg atttatttagc aggattacct tcatcaaaag accatcagtc 660  
aggtcgtctt gtcattgggc cagatcaaaa gatttattat acgattgggtg accaagggcg 720  
taaccagctt gcttatttgt tcttgccaaa tcaagcacia catacgccaa ctcaacaaga 780  
actgaatggt aaagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgcttaa atcttgatgg 840  
aagtattcca aaggataatc caagttttta cgggggtggtt agccatattt atacacttgg 900



acatcgtaat ccgcagggt tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960  
aggcccaaac tctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020  
gaatgtagca ggttataaag atgatatggt ctatgcttat gcaaattatt cagcagcagc 1080  
caataagtca attaaggatt tagctcaaaa tggagtaaaa gtagccgcag gggtcctgt 1140  
gacgaaagaa tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200  
cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttgtgga gagatgacct acatttgctg 1260  
gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaag caattactgg 1320  
ttgggaaaat acattattgg ttccatcttt aaaacgtggt gtcattttcc gtattaagtt 1380  
agatccaact tatagcacta cttatgatga cgctgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440  
ttatcgtgat gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctta tatgtattaa ctgatactgc 1500  
cggaaatgtc caaaaagatg atggctcagt aacaaatata ttagaaaacc caggatctct 1560  
cattaagttc acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<220>

<222> 4

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 5

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 3

Gly Arg Asn Xaa Xaa Ala Tyr Leu

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 4

ataagcaagc gggttacgc cc 22

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 5

caaataagca agcccgttac gcccttg 27

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 6

caaataagca gcctgggttac g 21

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 7

gaacaaataa gcaccctggt tacgccc 27

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 8

cctgactgat gttcttttga tgaagg 26

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 9

catctttttg gacagttccg gcagtat 27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 10

caaataagca agcaggttac gcccttg 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 11

caaataagca agaaagttac gcccttg 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 12

caaataagca aggctgttac gcccttg 27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 13

caaataagca aggttggttac gcccttg 27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 14

caaataagca agatcggttac gcccttg 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 15

caaataagca agttcggttac gcccttg 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 16

caaataagca agtttggttac gcccttg 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 17

gaacaaataa gccatctggt tacgccc 27

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 18

gaacaaataa gctttctggt tacgccc 27

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 19

gaacaaataa gccactggt tacgccc 27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08418

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1<sup>7</sup> C12N9/04, C12N15/53, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10  
C12Q1/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1<sup>7</sup> C12N9/04, C12N15/53, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10  
C12Q1/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUS FILE (JOIS)  
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/34919 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH), 02 May, 2002 (02.05.02), & US 2003/0104595 A1	1-25
X	JP 2001-346587 A (Koji HAYADE), 18 December, 2001 (18.12.01), (Family: none)	1-25
X	EP 1176202 A1 (Koji HAYADE), 30 January, 2002 (30.01.02), & WO 00/66744 A1 & JP 2000-312588 A & JP 2001-197888 A	1-25
X	EP 1167519 A1 (Koji HAYADE), 02 January, 2002 (02.01.02), & WO 00/61730 A1 & JP 2000-350588 A & JP 2000-354495 A	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing

date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is

cited to establish the publication date of another citation or other

special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other

means

"P" document published prior to the international filing date but later

than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or

priority date and not in conflict with the application but cited to

understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered novel or cannot be considered to involve an inventive

step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be

considered to involve an inventive step when the document is

combined with one or more other such documents, such

combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 July, 2003 (25.07.03)

Date of mailing of the international search report

05 August, 2003 (05.08.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/04, C12N15/53, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/32

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/04, C12N15/53, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JSTPLUSファイル(JOIS)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/34919 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 2002.05.02 & US 2003/0104595 A1	1-25
X	JP 2001-346587 A (早出広司) 2001.12.18 (ファミリーなし)	1-25
X	EP 1176202 A1 (早出広司) 2002.01.30 & WO 00/66744 A1 & JP 2000-312588 A & JP 2001-197888 A	1-25
X	EP 1167519 A1 (早出広司) 2002.01.02 & WO 00/61730 A1 & JP 2000-350588 A & JP 2000-354495 A	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.07.03

国際調査報告の発送日

05.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488